

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

1c978 U.S. PTO
10/045539
10/26/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年10月31日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-332252

出 願 人

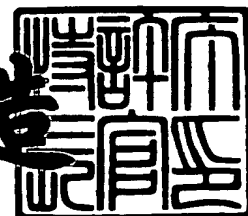
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2001年 9月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3084201

【書類名】 特許願

【整理番号】 A01487MA

【提出日】 平成12年10月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 1/04

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区西麻布2丁目26番30号 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 小川 雅司

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町2丁目12番1号 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 高橋 昌敏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町2丁目12番1号 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 花井 和子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 荒勝 浩

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【連絡先】 03-3271-1331

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9800464

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体試料の切断方法およびそれに用いる装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体試料を光照射によって切断する方法であって、支持体の片面上に生体試料と厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムとを設置し、支持体の生体試料を保持する面の反対側から光を照射して生体試料の目的部分を切断することを特徴とする方法。

【請求項 2】 生体試料が、生体組織片、細胞、染色体または微生物である、請求項 1 に記載の切断方法。

【請求項 3】 光がレーザー光である、請求項 1 又は 2 に記載の切断方法。

【請求項 4】 光が紫外線レーザー光である、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の切断方法。

【請求項 5】 支持体が、ガラス支持体である請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の切断方法。

【請求項 6】 着色フィルムがアラミドフィルムである、請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の切断方法。

【請求項 7】 支持体の片面上に厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムを設置し、その上に生体試料を設置する、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の切断方法。

【請求項 8】 目的部分の切断を顕微鏡下で行なう、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の切断方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 8 の何れかに記載の切断方法により生体試料を切断し、切断した試料を回収することを特徴とする、生体試料の切断回収方法。

【請求項 10】 支持体の片面上に厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムを設置して成る、生体試料切断用の装置。

【請求項 11】 支持体がガラス支持体である請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】 着色フィルムがアラミドフィルムである、請求項 10 又は 11 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料の切断方法、およびそれに用いる装置に関する。より詳細には、本発明は、生体試料に光を照射することによって、生体試料の目的部分を切断することを特徴とする方法およびそれに用いる装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

マイクロアレイ法は、スライドガラス上にスポットさせたDNAと調べたい組織や細胞から抽出したRNAから作製した標識プローブとをハイブリダイズさせてシグナルを検出し、このシグナルの強度からハイブリダイズしたスポットに相当する遺伝子の相対的な発現量を測定する方法である。このようなマイクロアレイ技術の開発が進んだことにより、数千から数万の多数の遺伝子の発現を一度に解析することが可能になった。この方法により、癌や白血病など複数の遺伝子異常が関与する疾患でどのような遺伝子の発現異常が起こっているかを網羅的に調べることができる。このような疾患の原因や発症機構などの解明などを目的とした研究においては、生体試料から特定の細胞のみを抽出することが重要である。

【0003】

例えば、ヒト腫瘍の分子的研究では、ヒト腫瘍細胞におけるタンパク質又は核酸の発現を定量的に又は定性的に評価することが必要となるが、そのためには腫瘍細胞と正常細胞とを分別して回収し、それぞれの細胞における標的核酸又は標的タンパク質の発現量を分析して両者を比較することが必要である。

【0004】

しかしながら、侵入性腫瘍の組織では、多くの細胞種（例えば、腫瘍細胞、基質細胞、内皮細胞、正常上皮細胞及び炎症細胞など）が存在する。腫瘍細胞におけるタンパク質又は核酸の発現を定量的に又は定性的に正確に評価するためには、腫瘍組織に存在する多数の細胞種の中から、腫瘍細胞のみを回収することが必要であり、そのためには生体試料を標的位置で切断することが必要である。

【0005】

生体組織片、細胞、染色体および微生物等の生体試料を標的位置で切断し、切断した試料を回収するための方法としては、試料にレーザー光を照射して切断・

回収する方法（レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法）が知られている（Emmert-Buck, M.R. et al., Science 274, 998-1001, 1996 ; 及び Bonner, R. R. et al.: Science, 278, 1481-1482, 1997）。この方法は、生体試料をフィルムに貼り付け、標的部位を切断した後、フィルムを剥離することにより切断片を回収する方法である。しかしながら、これら従来の方法では、フィルムの厚さが薄いため、操作性が悪く、特に支持体へのフィルムの設置の取り扱いが困難という問題があり、またレーザー光による切断の切れ具合（シャープさ）にも改善の余地があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、生体組織片、細胞、染色体および微生物等の生体試料を標的位置で切断し、切断した試料を回収するための新規な方法を提供することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、生体試料をフィルムに付着させ、標的部位を切断した後、フィルムを剥離することにより切断片を回収する方法であって、操作性に優れ、レーザー光による切断の切れ具合（シャープさ）が良好な方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、生体試料に付着させるフィルムとして厚さ3～6 μ mの着色フィルムを使用することにより、上記課題を解決した生体試料を標的位置で切断するための優れた方法を提供できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明によれば、生体試料を光照射によって切断する方法であって、支持体の片面上に生体試料と厚さ3～6 μ mの着色フィルムとを設置し、支持体の生体試料を保持する面の反対側から光を照射して生体試料の目的部分を切断することを特徴とする方法が提供される。

本発明は、切断した試料を回収することをさらに含むことを特徴とする、生体試料の切断回収方法にも関する。

【0 0 0 9】

本発明の別の側面によれば、支持体の片面上に厚さ $3 \sim 6 \mu\text{m}$ の着色フィルムを設置して成る、生体試料切断用の装置が提供される。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明による生体試料を光照射によって切断する方法は、支持体の片面上に生体試料と厚さ $3 \sim 6 \mu\text{m}$ の着色フィルムとを設置し、支持体の生体試料を保持する面の反対側から光を照射して生体試料の目的部分を切断することを特徴とする。

本発明で用いる生体試料は、生体に由来するものであればその種類は特に限定されないが、例えば、生体組織片、細胞、染色体または微生物などが挙げられる。生体試料としては、例えば疾患部位（例えば、癌など）を含む生体試料を用いることができ、この場合、本発明の方法により疾患の細胞（例えば、癌細胞）を正常細胞から分離して、回収することができる。

【0 0 1 1】

本発明で用いる光は好ましくはレーザー光であるが、その理由は、レーザー光は一定表面上の小さな領域に容易かつ効果的に集中することができる光であるからである。レーザー光の波長は通常、 $150 \sim 10,000 \text{ nm}$ 程度であり、特に好ましくは紫外線レーザー光（ $180 \sim 400 \text{ nm}$ の波長）である。レーザー光の場合、そのビーム径は、生体試料の種類や厚み等によって適宜に設定する必要があるが、通常は、 $1 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ 程度とすることができる。また、光の強度は、生体試料の種類や厚み、切断片の大きさ等によって適宜とすることができる。例えば、生体試料が組織切片の場合には $0.5 \sim 3.0 \text{ J/cm}^2$ 程度、細胞の場合には $0.1 \sim 3.0 \text{ J/cm}^2$ 程度、染色体および微生物の場合には $0.01 \sim 3.0 \text{ J/cm}^2$ 程度とすることができる。

【0 0 1 2】

本発明で用いる支持体は、光を透過できるものであればその種類は特に限定されないが、好ましくは透明支持体であり、例えば、ガラス支持体（スライドガラ

ズ又はカバーガラスなど) やポリエチレンテレフタレート支持体などが挙げられる。

【0013】

本発明で用いる着色フィルムは厚さが3～6 μm であることを特徴とする。厚さが3 μm 未満であると、操作性が劣り、支持体への設置操作などが煩雑となるため好ましくなく、厚さが6 μm を超えると光による切断が困難になり好ましくない。本発明では透明フィルムではなく着色フィルムを用いることを特徴とするが、これを着色フィルムを用いることにより光による切断が容易になるという効果が得られることを利用したものである。

【0014】

本発明で用いることができる着色フィルムの具体例としては、黄色を有するアラミドフィルムを挙げることができる。このようなアラミドフィルムの具体例としては、テレフタル酸とパラフェニレンジアミンの重合体(パラフェニレンテレフタルアミド、以下PPTAとも称する)(Kevlar(登録商標)、Twaron(登録商標)、テクノーラ(登録商標)など)を挙げることができる。

【0015】

アラミドフィルムなどの着色フィルムは公知の方法で作成することができ、例えば、アラミドポリマーを濃硫酸に溶解し、このドープを脱気する。次に、適当な大きさのスリットを有するダイから、鏡面に磨いたタンタル製のベルトにキャストし、空気を吹きつけて、流延ドープを光学等方化し、ベルトとともに、硫酸水溶液の中に導いて凝固させる。このときにフィルム自身にカップリングを持たせることができる。次いで凝固フィルムをベルトからひきはがし、温水中、炭酸ナトリウム水溶液中、次いで25℃水中を走行させて洗浄する。洗浄の終了した含水率約280%のフィルムをまず室温でロールの周速差を利用して長尺方向(MD)に一軸延伸を行い、次いでテンターに入れて入口に近いところで幅方向(TD)に延伸しテンターの中央付近は150度に定長加熱して乾燥し、更にテンターの出口付近には赤外線ランプをとりつけて400℃で熱処理したのち、長尺フィルムを巻き取ることにより、PPTAフィルムを得ることができる。

【0016】

本発明の方法では、支持体の片面上に厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムを設置し、その上に生体試料を設置してもよいし（この場合は下側から、支持体、着色フィルム、生体試料という順番の構成になる）、あるいは、支持体の片面上に生体試料を設置し、その上に厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムを設置してもよいが（この場合は下側から、支持体、生体試料、着色フィルムという順番の構成になる）、好ましくは前者である。

本発明によれば、支持体の片面上に厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムとを設置して成る、生体試料切断用の装置も提供される。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法において生体試料の目的部分の切断を行なうためには、生体試料を好適な方法で染色することが好ましい。

本発明で用いることができる生体試料は、例えば、ヘマトキシリン・エオシンにより染色することができ、これにより、顕微鏡による可視化の下、特定の細胞集団の位置を識別することが可能になり、標的細胞を全体の組織から単離回収することが可能になる。

【 0 0 1 8 】

本発明の方法では、目的部分の切断を顕微鏡下で行なうことが好ましい。

具体的には、本発明による生体試料の切断方法は、例えば、上面に着色フィルムと生体試料（回収したい標的細胞を含む生体試料）を保持した透明支持体を顕微鏡のステージに設置し、顕微鏡のアイピースまたは CCD カメラで撮像した画像をモニターで確認しながら、透明支持体を介して生体試料の標的領域を決定する。標的領域の決定は、色素による染色又は免疫的染色などにより行なうことができる。

【 0 0 1 9 】

次に、例えばレーザー光（好ましくは、紫外線レーザー光など）照射装置のような光照射手段より光を発生させ、光のビーム径を絞り、生体試料の標的切断部位に沿って支持体の下側より生体試料に光を照射し、生体試料を切断する。光学顕微鏡の視野の光学中心上へレーザーの焦点を合わせることによって、活性化エネルギーが生体試料に接する着色フィルムの標的領域に集中的に供給されること

になる。また、レーザー照射の持続期間は、必要なエネルギー量が標的切断部位に向けられるように適宜調節することができる。

【0020】

本発明はさらに、上記した切断方法により生体試料を切断し、さらに切断した試料を回収することを特徴とする、生体試料の切断回収方法にも関する。

レーザー光の十分なエネルギーが生体試料の標的細胞と接触する着色フィルムの表面に吸収されると、接着層が着色フィルムと標的細胞との間で形成される。これにより、フィルムを除去して回収することにより、標的細胞を他の生体試料から分離回収することができる。

【0021】

分離回収される試料の大きさは、光（好ましくはレーザー光）の直径及びパルスの持続期間を変えることによって変更することができる。本発明の方法によれば、小さな $1\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ 程度の大きさの試料を回収することができる。さらに、レーザー光は、一つの細胞の直径よりも小さい範囲に集中して照射することも可能なので、単一の標的細胞又はその一部のみを分離回収することも可能である。

【0022】

切断した試料の回収の方法は特に限定されないが、例えば、切断のために照射したレーザー光のレンズの焦点をずらし、レーザーの径を広げパワーを分散させることにより切片をきるのではなく、切断された試料を支持体から剥がし上方へ飛ばすことができる。かくして支持体から剥がされた試料をマイクロチューブキャップなどの容器に回収することができる。

本発明の生体試料の切断方法の実施に使用できる装置としては、例えば、CRI-337 Laser ScissorsTM 337/120モジュール（米国セル・ロボテック社製）などを挙げることができる。

【0023】

上記のようにして切断回収された標的試料は溶解して保存し、目的とする分析に供することができる。標的細胞中に含まれるDNA又はRNAを分析する場合には、回収した試料をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）反応に供し、続いて、通

常の遺伝子解析法（例えば、サザンブロット、ノザンブロット、ドットブロットハイブリダイゼーション、あるいは配列決定等）に供することができる。

【0024】

例えば、mRNAは、オリゴdT上でのカラムクロマトグラフィーを用いて回収した試料から抽出することができる。標的細胞から回収されたmRNAはさらに、RT-PCR法により増幅することができ、これをさらに分析することができる。

【0025】

標的細胞中に含まれる特定のタンパク質又はポリペプチドを分析する場合には、回収した試料を、標識した基質を用いる酵素アッセイ、標識した抗体を用いるイムノアッセイ、生化学アッセイなどに供することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0026】

【実施例】

実施例1：本発明の方法によるマイクロダイセクション

（1）アラミドフィルムの作製

非磁性フィルムとしてのアラミドフィルムは以下の公知の方法で作成した。 η_{inh} （対数粘度）が5.5のPPTAポリマーを平均粒径80nmのコロイド状シリカを0.005重量%含む濃硫酸にポリマー濃度11.5%になるように溶解し、このドーブを約70℃に保ったまま、真空下に脱気した。0.15mm×300mmのスリットを有するダイから3.5m/分の吐出線速度で、鏡面に磨いたタンタル製のベルト（12m/分で移動）にキャストし、相対湿度約85%の約90℃の空気を吹きつけて、流延ドーブを光学等方化し、ベルトとともに、-5℃の15重量%硫酸水溶液の中に導いて凝固させた。このときにフィルム自身にカップリングを持たせることができる。次いで凝固フィルムをベルトからひきはがし、約40℃の温水中、炭酸ソーダの1%水溶液中、次いで25℃水中を走行させて洗浄した。洗浄の終了した含水率約280%のフィルムをまず室温でロールの周速差を利用して長尺方向（MD）に1.2倍に一軸延伸を行い、次いでテンターに入れて入口に近いところ

で幅方向 (TD) に 1.2 倍に延伸しテンターの中央付近は 150 度に定長加熱して乾燥し、更にテンターの出口付近には赤外線ランプをとりつけて 400℃ で熱処理したのち、長尺フィルムを巻き取った。得られた PPTA フィルムは、透明性にすぐれ、3.8 μ m 又は 4.2 μ m の厚さをもっていた。

【0027】

(2) 切断用試料の調製

スライドガラス (波長 377 nm のレーザーを透過するもの) に 2 cm 角のアラミドフィルム (実施例 1 で得たもの、厚さ 3.8 μ m 又は 4.2 μ m) を載せ、Nail Polish を用いて接着した。

マウス精巣組織をプラスチック製の凍結容器 (たとえば MILES 社製 Cryomond) にサクラ精機社製の O. C. T コンパウンドを入れ、試料組織を包埋した。液体窒素下で約 30 から 40 秒以内で試料を凍結させた。凍結試料を凍結切片作成装置 (クライオスタット) にて約 8 μ m の厚さにて薄切した。薄切切片をフィルムを貼り付けた上記作成スライドガラスの上に直接貼り付けた。

【0028】

凍結切片を貼り付けたスライドガラスを定法 (「染色法のすべて」医歯薬出版株式会社出版、1988 年 p 2 ~) に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行なった。ヘマトキシリンはマイヤーヘマトキシリン液 (和光純薬製)、エオジンは 1 % エオジン液 (和光純薬製) を用いた。

【0029】

(3) レーザーによる試料の切断

顕微鏡でスライドガラス上の試料を観察し、LS-337 Laser ScissorsTM 337/120 モジュール (システム全体の構成は CRI-337) (米国セル・ロボテック社製) を用いて試料を標的部位で切断した (マイクロダイセクション)。マイクロダイセクションの条件は以下の通りである。

窒素励起パルスレーザー

波長 337 nm

出力 1 ~ 120 μ J / パルス (可変) (カッティング時は 65 ~ 80 %、100 pps で行うので、約 80 μ J / パルス程度)

【0030】

続いて、レーザー光のレンズの焦点を下方にずらすことにより、レーザーの径を広げパワーを分散させることにより切断された切片をスライドガラスから剥がし、上方へ飛ばすことにより、切断切片をマイクロチューブキャップに回収した。

【0031】

マイクロダイセクションの前後の試料、並びに切断かつ回収された標的部位の試料の様子を図1に示す。図1に示す通り、本発明の方法により組織の標的部位をうまく切断および回収することができた。

【0032】

実施例2：本発明の方法と比較例との比較

スライドガラスの上に載せるフィルムの材質と厚さを以下の表1の通りに変更した以外は、実施例1と同様に生体試料を載せ、マイクロダイセクションを行なった。

フィルムのスライドガラスへの貼付適性（操作性）、マイクロダイセクション適性、切れ具合（シャープカット）について○、△、×の3段階で評価した結果を以下の表1に示す。

【0033】

【表1】

厚さ (μm)	1. 0	3. 6	4. 2	7. 4
材質	PET (透明)	アラミド (黄色)	アラミド (黄色)	PET (透明)
スライドガラス貼付適性	×	△	○	○
マイクロダイセクション適性	○	○	○	×
切れ具合 (シャープカット)	△	○	○	×
備考	比較例	本発明	本発明	比較例

【0034】

表1の結果から、本発明の方法が優れていることが分かる。

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】

本発明により、生体試料をフィルムに付着させ、標的部位を切断した後、フィルムを剥離することにより切断片を回収する方法であって、操作性に優れ、レーザー光による切断の切れ具合（シャープさ）が良好な方法を提供することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、マウス精巣試料をマイクロダイセクションにより回収した場合の結果を示す図である。

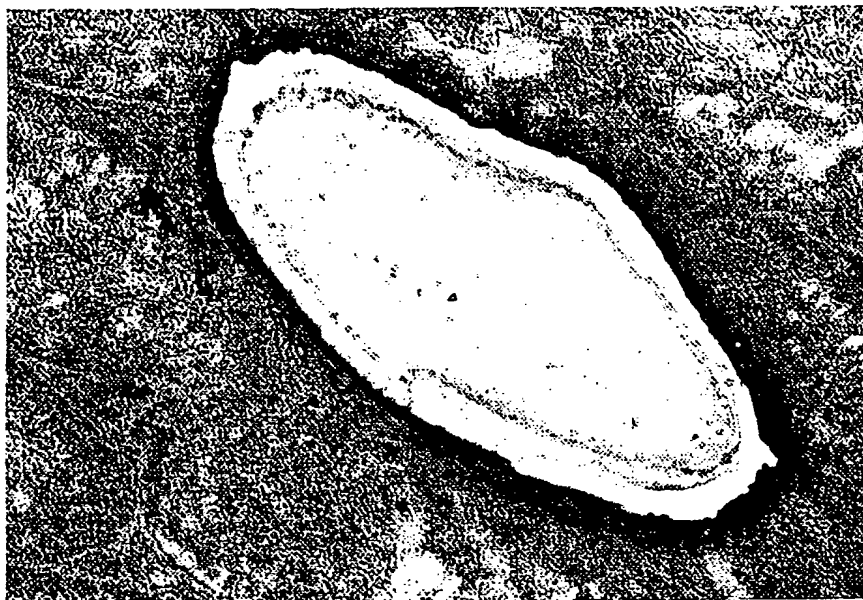
特 2 0 0 0 - 3 3 2 2 5 2

【書類名】

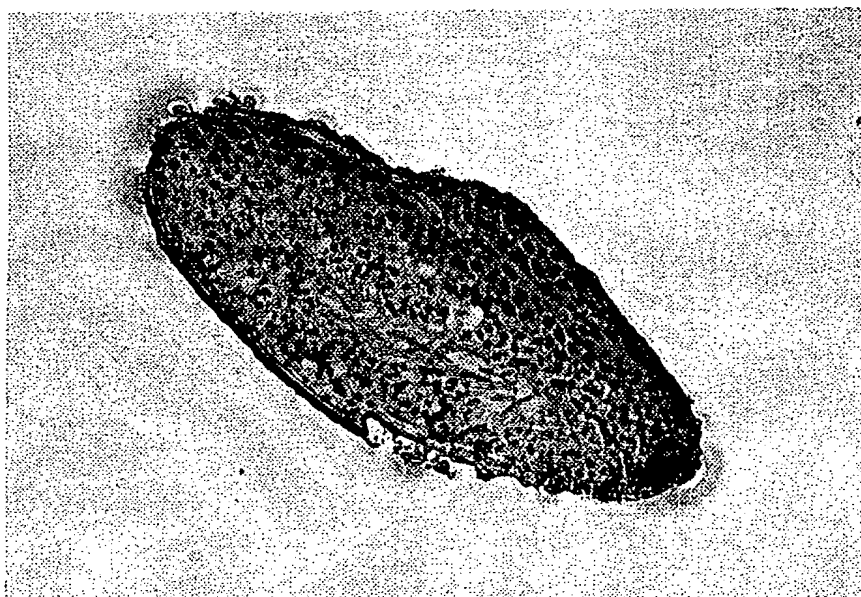
図面

【図1】

サンプル：マウス 精巣



マイクロダイセクション後



マイクロダイセクションにて回収したサンプル
($350\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体試料をフィルムに付着させ、標的部位を切断した後、フィルムを剥離することにより切断片を回収する方法であって、操作性に優れ、レーザー光による切断の切れ具合（シャープさ）が良好な方法を提供すること。

【解決手段】 生体試料を光照射によって切断する方法であって、支持体の片面上に生体試料と厚さ 3 ～ 6 μ m の着色フィルムとを設置し、支持体の生体試料を保持する面の反対側から光を照射して生体試料の目的部分を切断することを特徴とする方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名 富士写真フイルム株式会社